

Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze
Katedra fyziologie živočichů



Myofibrilární organizace PCr/CK systému v kosterním svalu

RNDr. Jitka Žurmanová

Doktorská disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Mejsnar, DrSc.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	2
Úvod	3
Přehled literatury	
1. Fyziologický význam PCr/CK systému	5
1.1 Energetický metabolismus u CK deficientních organismů	8
1.2 Organizace PCr/CK systému ve svalové buňce	9
1.2.1 Isoformy kreatinkinasy	9
1.2.2 Lokalizace cytosolické isoformy MM-CK	10
1.2.3 Lokalizace a funkce mitochondriální isoformy mtCK	11
1.3 Kompartmentalizace metabolitů myofibrilárního PCr/CK systému	12
1.3.1 Adeninové nukleotidy	12
1.3.2 Kreatin a fosfokreatin	13
2 Význam změny Gibbsovy volné energie	14
3 Přednostní metabolický tok neboli „substrate channelling“	16
3.1 Fyziologický význam „substrate channelling“	18
4 PCr/CK systém v M-linii sarkomery	20
4.1 Sarkomera jako nejmenší funkční jednotka	20
4.2.1 Význam M-linie	21
4.2.2 Interakce strukturálních proteinů v M-linii	23
4.2.3 Interakce CK v M-linii sarkomery	25
4.2.4 Variabilita M-linie dle typu svalu	26
Souhrn výsledků	28
Seznam citované literatury	30
Příloha 1 – Přehled genové exprese isoform CK a porovnání primárních struktur	43
Příloha 2 – Výsledky	52
2.1 Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. (Štefl et al. 1994)	
2.2 Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibers and their myofibrils. (Gregor et al. 1999)	
2.3 Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. (Gregor et al. 2003)	
2.4 Creatine kinase binds more firmly to the A-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates. (Žurmanová et al. 2007, accepted)	

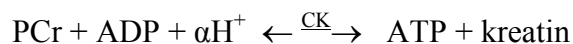
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosin-5'-difosfát
AK	adenilátkinasa
AMP	adenosin-5'-monofosfát
ANT	mitochondriální ATP/ADP translokasa
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATPasa	adenosintrifosfáta
B-CK; BB-CK	mozková isoforma kreatinkinasy (monomer; dimer)
CK	kreatinkinasa
Cr	kreatin
CRT	kreatinový transportér
ECM	extracelulární matrix
FLIP	Fluorescence Lost in Photobleaching-metoda pro sledování pohybu fluorescenčně značených molekul
G	Gibbsova volná energie
IMP	inositolmonofosfát
K'_{eq}	rovnovážná konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
Lys, K	lysin
MB-CK	hybridní kreatinkinasa (dimer)
M-CK, MM-CK	svalová isoforma kreatinkinasy (monomer; dimer)
MgADP	hořčnatý komplex adenosin-5'-difosfátu
MgATP	hořčnatý komplex adenosin-5'-trifosfátu
Mi _a -CK	všudypřítomná isoforma mitochondriální kreatinkinasy
Mi _b -CK	sarkomerická isoforma mitochondriální kreatinkinasy
Mi-CK	mitochondriální kreatinkinasa
NMR spektroskopie	nukleární magnetická rezonanční spektroskopie
PCr	kreatinfosfát
PCr/CK systém	kreatinfosfát/kreatinkinasoný systém
RTG difrakce	difrakce rentgenových paprsků (rentgenová krystalografie)
VDAC	mitochondriální napětově závislý aniontový kanál

ÚVOD

Fosfokreatin/kreatinkinasový systém (PCr/CK systém) je významnou součástí energetického metabolismu všech excitabilních buněk a buněk s vysoce kolísavými požadavky na dodávku energie. Jeho myofibrilární uspořádání představuje výhodný model pro studium obecných principů řízení enzymatické reakce, neboť myofibrila je nejjednodušší subcelulární strukturou, která si zachovává fyziologickou funkci svalové buňky – kontrakci, a zároveň umožňuje studium Lohmanovy reakce na biochemické a molekulární úrovni.

Studie energetického metabolismu svalu vedly k objevům ATP a fosfokreatinu (PCr), který byl poprvé nalezen ve svalové tkáni před 80 lety (Fiske a Subbarow 1927, Eggleton a Eggleton 1929). V té době PCr považován za bezprostřední zdroj energie využívaný ke svalové kontrakci. Krátce poté Lohman (1934) objevil enzym, dnes známý pod názvem kreatinkinasa, který katalyzuje přenos fosfátové skupiny z fosfokreatinu (PCr) na ADP a tím regeneruje ATP, v obráceném směru je kreatin (Cr) fosforylován v přítomnosti ATP za vzniku PCr a ADP:



O 50 let později bylo kvantitativními studiemi pomocí ^{31}P nukleární magnetické rezonance (NMR) (Ackerman et al. 1980) prokázáno, že hladina ATP se v kontrahujícím svalu nemění, protože je doplňována štěpením PCr.

Pro Lohamnovu reakci platí:

- 1) Slouží jako „pufr“ koncentrace ATP v buňkách s intenzivním a velmi proměnným obrátem (turnover) ATP
- 2) Rychlosti reakce ve směru zleva doprava (forward, downstream) a zprava doleva (reverse, upstream) jsou v klidovém stavu svalu stejné a tudíž reakce probíhá blízko rovnováhy
- 3) Pozice této rovnováhy je závislá na pH daného buněčného kompartmentu (Kushmerick 1998).

Předkládaná práce se zabývá dynamikou interakce cytosolické isoformy kreatinkinasy (MM-CK, dále pouze CK) s M-linií sarkomery izolovaných myofibril, v souvislosti s významem této interakce pro řízení CK reakce v buňce. Dále se zabývá energetickou charakteristikou CK reakce, kvantifikací jejích substrátů za různých experimentálních stavů svalu a myofibril.

Současně práce sleduje význam přednostního metabolického toku ATP mezi CK vázanou v M-linii sarkomery a myosinovu ATPasou na struktuře izolovaných myofibril.

Cíle:

1. Zavedení metodiky pro studium PCr/CK systému a energetického metabolismu kosterního svalu za různých experimentálních podmínek.
2. Evaluace specifické aktivity kreatinkinasy na permeabilizovaných vláknech a izolovaných myofibrilách na pozadí efektu přednostního metabolického toku mezi CK vázanou v M-linii sarkomery a myosinovou ATPasou.
3. Vyjádření rozdílu mezi metabolizovaným PCr a produkovaným ATP, který je měřítkem přednostního metabolického toku neboli „substrate channelling“ mezi CK vázanou na myofibrilách a myosinovou ATPasou; zjistit stupeň závislosti „substrate channelling“ na hodnotě pH .
4. Charakteristika vazby CK s M-linií sarkomery izolovaných myofibril (i) v souvislosti s vlivem substrátů CK reakce, (ii) v závislosti na změnách hodnoty pH ve fyziologickém rozsahu při kontrakci a relaxaci.

Výsledky se týkají obecných regulačních principů PCr/CK systému a mohou přispět k porozumění některých adaptačních strategií a patologických procesů, ke kterým dochází při zasažení energetického metabolismu včetně tohoto systému; např. ISCHS, myopatie, Alzheimerova choroba a další.

Disertační práce je prezentována formou přehledu dosud získaných poznatků, včetně původních prací autorky, které tvoří čtyři samostatné přílohy. Závěrečné shrnutí rekapituluje v bodech hlavní výsledky této práce.

1. Fyziologický význam PCr/CK systému

Kompartmentalizace PCr/CK systému je charakteristická pro zralé, vysoce organizované buňky obratlovců a zvláště savců, jako důsledek specializace míst produkce energie a její spotřeby s následnou nutností přenosu energie mezi těmito dvěma místy. Toto uspořádání umožňuje plnit vysoké a velmi proměnlivé nároky na transport a spotřebu energie bez velkých výkyvů v koncentraci substrátů a produktů (Saks a Ventura-Clapier 1992, Wallimann et al. 1992).

Isoenzymy CK jsou lokalizovány v energii transformujících a energii využívajících oddílech buňky, kde jsou funkčně spojeny se syntézou či spotřebou ATP. Tento zdroj energie pro veškeré endergonické reakce živočišných organismů, je primárně produkován dvěma základními mechanismy: oxidativním metabolismem v mitochondriích a anaerobním metabolismem glykolýzy. Oblasti produkce energie jsou tedy počátkem PCr/CK systému, který zajišťuje přenos vysokoenergetického fosfátu z těchto míst k místům její spotřeby. Cílovým místem ve svalové buňce jsou tedy příslušné ATPasy, které umožňují přímo posuv kontraktálních filament, a které zajišťují veškeré energeticky náročné děje související se spřažením excitace a kontrakce nebo relaxace (Bessman a Geiger 1981, Wallimann et al. 1992).

PCr/CK systém tak vytváří „energetický pufir“, který překlenuje náhlý požadavek na zvýšenou spotřebu energie na začátku vysokého výkonu. Fosfokreatin zde působí jako rezervoár makroergního fosfátu, který je okamžitě dostupný k aerobní regeneraci ATP a je přednostně využíván (Mommaerts 1969). Základním principem této koncepce je existence kreatinkinasové reakce v rovnovážném stavu, kdy je $K'_{eq} = \frac{[ATP] \times [Cr]}{[ADP] \times [PCr]}$ rovno 166 při pH 7.0, 38°C, $[Mg^{2+}] = 10^{-3} M$, a poměr ATP/ADP větší než 100 (Lawson a Veech 1979, From et al. 1990).

Další úloha PCr/CK systému je vytváření „prostorového energetického pufiru“, který transportuje PCr usnadněnou difusí k místům jeho budoucí spotřeby (Meyer et al. 1984). PCr/CK systém tak naplňuje požadavky „systému metabolické kapacity“ vyplývající z prací Meyera (1988), který zahrnuje prostorový i časový aspekt. Metabolická kapacita PCr/CK systému, umožňuje rovnoměrnou distribuci energie, i když je její produkce omezena jen na některá místa v buňce (Mainwood a Rakušan 1982) a zároveň vysvětluje pokrytí velmi náhlých a intenzivních nároků na dodávku energie (Sweeney 1994).

Třetí úloha PCr/CK pufru je převážně v zajištění vhodných lokálních poměrů ATP/ADP v jednotlivých kompartmentech, kde je CK funkčně spojena s procesy využívajícími ATP. Udržování vysokého poměru ATP/ADP v blízkosti ATPas, zvyšuje termodynamickou účinnost hydrolýzy ATP a tím i schopnost buňky využít energii makroergních vazeb (Kammermeier 1987). Stejný termodynamický aspekt má též kretinkinasová reakce v místě syntézy ATP, kde je snížení volné energie nutným předpokladem pro tuto reakci (Wallimann a Eppenberger 1985, 1990, Wallimann et al. 1989).

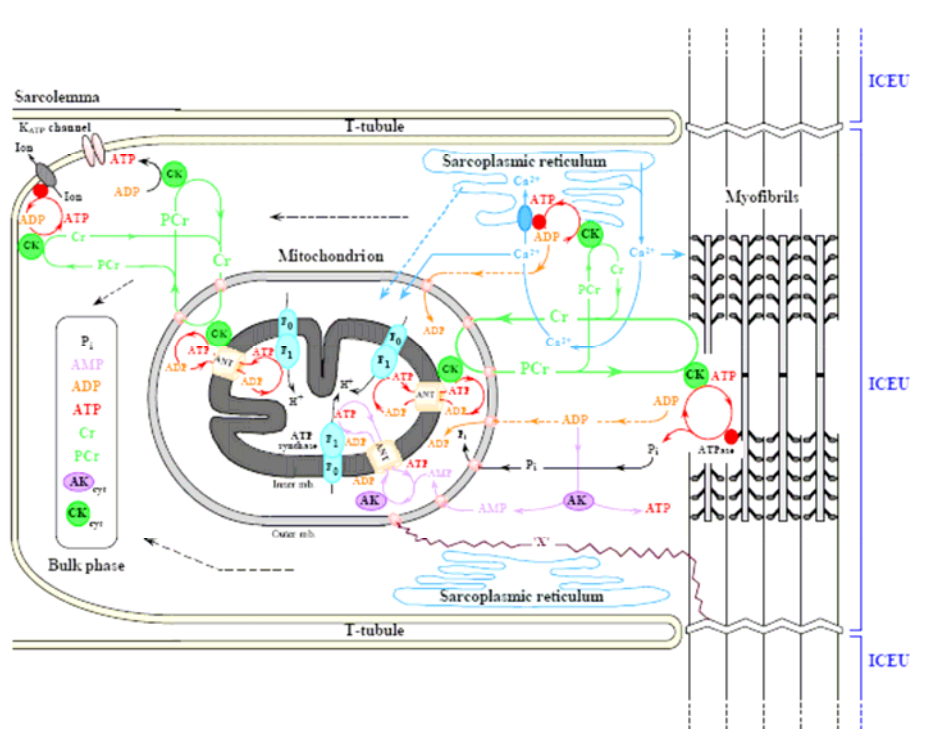
PCr/CK systém je citlivý sensor hladiny ADP jehož rovnovážná konstanta pro ADP je 10-35 μM (Matthews 1982, Levin et al. 1990). Proto má rozhodující úlohu v udržování nízké hladiny ADP zvláště v přechodném období, kdy spotřeba energie překračuje produkci. Systém tak brání inhibici ATPas zvýšenou koncentrací ADP, který je jejich čistým kompetitivním inhibítorem. Disociační konstanta ADP (při štěpení ATP) je sice v kosterním svalu (170 μM) zhruba řádově vyšší než v srdečním svalu (10 μM) (Siemankowski a White 1984, Sleep a Glyn 1986), ale jeho přímý inhibiční efekt se projevuje v širokém rozsahu koncentrace (Cooke a Pate 1985). Je tedy možné říci, že enzym, který kontroluje lokální hladinu ADP v oblasti myosinových hlav, bude určující pro modulaci kontraktlní aktivity. A to může být další významná úloha CK vázané na myofibrilách.

CK reakce váže kromě ADP i protony (H^+), produkované myosinovou ATPasou (ATPasami obecně) při kontrakci. To přináší další význam funkčního spojení CK systému s ATPasami, který předchází lokálnímu okyselení zvláště v počátcích svalové práce než se aktivuje glykogenolýza.

Další metabolickou funkcí je uvolňování anorganického fosfátu (P_i) hydrolýzou PCr, které tak zvyšuje jeho hladinu v průběhu kontrakce rychleji a tím zesiluje signál pro aktivaci glykogenolýzy a glykolýzy. Je to nepřímý regulační efekt uplatňující se u svalů závislých na glykolýze (Chasiotis et al. 1982).

PCr/CK systém reprezentuje účinný regulátor energetického toku a využívá přenosu metabolitů k jemnému vyladění lokální hladiny ATP. Význam tohoto regulovaného okruhu, který působí ve vysokých hladinách PCr a Cr a je citlivý vůči ADP i AMP skrze adenylát kinasovou reakci (Dzeja et al.1998), roste v případě vážného stresu jako je hypoxie nebo

ischémie. V tomto případě nárůst AMP aktivuje kompenzační mechanismy pro zvýšení dodávky energie a snížení její spotřeby přes AMP aktivovanou proteinkinasu (AMPK) a další AMP sensitive komponenty (Pucar et al. 2004, Kahn et al. 2005). AMP je inhibítoem adenylátkinasy a glukoneogeneze (Yamada a Sugi 1989), a v případě růstu jeho koncentrace je konvertováno na IMP a amoniové kationy pomocí AMPdeaminasy (Kushmerick a Davies 1969), která je vázána po obou stranách A-pruhu (Cooper a Trinick 1984). Defosforylovaný AMP i IMP buňka ztrácí, pomocí 5' nukleotidasy lokalizované na sarkolemě, v případě její propustnosti (Bowditch et al. 1985, Jennings et al. 1981). Důležitým příspěvkem PCr/CK systému je tedy zabránění ztráty nukleotidů udržováním nízké hladiny ADP.



Obr. 1 Kompartmentalizace PCr/CK systému a jeho funkční spojení s oxidativní fosforylací, ATPasami a adenylátkinasovým (AK) systémem ve svalové buňce. Zelená kolečka označují lokalizaci kreatinkinasy (CK), červená kolečka ATPasy, fialové ovály adenylátkinasy (AK). Jejich substráty a produkty jsou označeny odpovídajícími barvami. (Andrienko et al. 2003)

1.1 Energetický metabolismus u CK deficientních organismů

Vedle výše popsaného PCr/CK systému, existují další dva komplementární přenašeče makroergního fosfátu; zmíněný systém adenylátkinasy (AK) a glykolytické enzymy, které pracují ruku v ruce s CK a AMPK jako energetickým senzorem (Ponticos et al. 1998, Dzeja a Terzic 2003, Neumann et al. 2003, Kahn et al. 2005). Jeden z hlavních výstupů ze studia organismů s delecí genů pro AK1 a CK je zjištění, že glykolytické enzymy mají schopnost zajistit síť pro dostatečný přenos a distribuci makroergního fosfátu v buňce (Dzeja et al. 1998, 2004, Pucar et al. 2002, Janssen et al. 2003). Tento nový pohled na glykolytický metabolismus společně s jeho vyhovující prostorovou kapacitou přenosu fosfátu (zvláště glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy a fosfoglycerátkinasy) (From et al. 1986, Kingsley et al. 1987) činí glykolýzu rovnocenným partnerem CK a AK systémům v síti buněčné distribuce energie (Dzeja a Terzic 2003, Dzeja et al. 2004).

U CK $-/-$ deficientních myši byla pozorována výrazná aktivace glykolýzy a snížení koncentrace anorganického fosfátu (Pi) (Van Deursen et al. 1993, Katz et al. 2003). Tudiž v případě CK deficientního svalu nemá ani zvýšená koncentrace Pi, ani koverze fosforylasy *a* na fosforylasu *b* úlohu v aktivaci glykolýzy jak zdůrazňovali autoři v 90-tých letech (Chasiotis et al. 1982, Chasiotis 1983). Zdá se, že majoritním mechanismem zvýšení glykolýzy je AMP závislá aktivace fosforylasy *b* (Katz et al. 2003).

Dalším významným adaptačním mechanismem na CK deficienci je změna prostorového uspořádání svalové buňky (Steeghs et al. 1997, Novotova et al. 2006). Byla popsána zvýšená mitochondriální kapacita a prostorové přeskupení mitochondrií (Steeghs et al. 1998, Van Deursen et al. 1993, Veksler et al. 1995). Též dochází k tranzici isoform těžkých řetězců myosinu u rychlých svalů ve směru k pomalým isoformám, u smíšených svalů ke změnám neodchází (Foley et al. 1994, Steeghs et al. 1998). Změna kontraktility v některých případech nebyla zaznamenána (Veld et al. 2006), u jiných experimentů byl prokázán výrazný propad kontraktilní funkce po několika počátečních záškubech (Roman et al. 2002).

Následující otázka se může týkat toho, jak funkční spojení CK a myosinové ATPasy souvisí s kontraktilitou u normálních zvířat. Již v r. 1953 Bolzer ukázal, že PCr výrazně zvyšuje efektivitu ATP, zvyšuje sílu kontrahujících se vláken a urychluje relaxaci. To znamená, že kontrakce potřebuje pouze malé množství adeninových nukleotidů pevně vázaných na kontraktilním aparátu. Savabi et al. (1983) demonstrovali na izolovaných vlákních psoasu, že

přítomnost malého množství ADP a 10 mM PCr produkovalo daleko rychlejší a silnější kontrakci a rychlejší a kompletnější relaxaci než přítomnost 10 mM ATP.

1.2 Organizace PCr/CK systému ve svalové buňce

1.2.1 Isoformy kreatinkinasy

U vyšších obratlovců se vyskytuje pět samostatně kódovaných isoform CK, které se skládají z monomerů o molekulové hmotnosti zhruba 40000. Expres jednotlivých isoenzymů je tkáňově specifická a CK isoformy se rovněž liší intracelulární lokalizací.

Dvě cytosolické isoformy B-CK (brain) a M-CK (muscle) vytvářejí dimery (MM-, MB-, BB-CK) o molekulové hmotnosti 80-86000 (Eppenberger et al. 1967). Zatímco MM-CK je charakteristická pro plně diferencovanou svalovou tkáň, BB-CK se vyskytuje v mozku a řadě dalších tkání (Wallimann a Hemmer 1994). Během diferenciac svalové tkáně dochází k výměně původní BB-CK přes přechodný hybrid MB-CK za MM-CK homodimer (Trask et al. 1988).

Tři mitochondriální isoformy jsou kódovány třemi geny CKMT1A, CKMT1B a CKMT2, avšak proteinový produkt genů CKMT1A, CKMT1B je shodný. Liší se od sebe tedy proteiny kódované CKMT1 a CKMT2 izoelektrickým bodem a v literatuře jsou označovány jako Mt_a- a Mt_b- CK (index "a" označuje kyselou a index "b" zásaditou isoformu, Quemeneur et al. 1989). Isoforma „a“ je často označována jako všudypřítomná a isoforma „b“ jako sarkomerická specifická pro sval. Isoenzymy Mt_a- a Mt_b- CK se neliší pouze sekvenčně, ale rovněž řadou biochemických a biofyzikálních parametrů (Schlegel et al. 1988). Geny kódující jednotlivé isoformy CK a jejich lokalizace jsou uvedeny v tab.1 a detailní informace o jednotlivých isoformách jsou uvedeny v Příloze 1.

Pokusy s 2D elektroforézou a chromatofokusací odhalily heterogenitu u B-CK i M-CK (George et al. 1984). Příčinou existence jednotlivých enzymových podtypů jsou alternativní místa iniciace při translaci (Soldati et al. 1990) a postranlační fosforylace, prokázaná u kuřecí, myši a krysí B-CK (Hemmer et al. 1993). Tři různé podtypy M-CK, lišící se izoelektrickým bodem (pI) byly detekovány u potkana pomocí 2D SDS-PAGE v oblasti mírně alkalického pH

(7.17 - 7.48) (Maláčová et al. 2004) zatímco u opice pI přechází z kyselého do alkalického pH (6.8-7.1) (Grossman a Mollo 1979).

CKB	14q32.32	kreatinkinasa, mozek
CKM	19q13.2-q13.	kreatinkinasa, sval
CKMT1A	15q15	kreatinkinasa, mitochondriální 1A
CKMT1B	15q15	kreatinkinasa, mitochondriální 1B
CKMT2	5q13.3	kreatinkinasa, mitochondriální 2 (sarkomer)

Tab.1 Tabulka isoform CK. Obsahuje označení kódujícího genu (1.sloupec), lokalizaci genu na chromozomu (2.sloupec) a název isoformy (3. sloupec). (<http://www.genecards.org>)

1.2.2 Lokalizace cytosolické isoformy MM-CK

Většina cytosolické M-CK může být u permeabilizovaných vláken odmyta roztokem fyziologické iontové síly, ale zhruba 5-10% tohoto enzymu zůstane specificky navázáno v M-linii sarkomery (Turner et al. 1973, Wallimann et al. 1977). Dalším místem specifické vazby M-CK je membrána sarkoplasmatického retikula, kde podporuje činnost ATPdependentní Ca^{2+} -pumpy a napomáhá regulaci lokálního poměru ATP/ADP (Rossi et al. 1990). Na sarkolemě vytváří M-CK další mikrokompartment s Na^+/K^+ ATPasou (Sharov et al. 1977). Na intaktním svalu byla identifikována další oblast slabé asociace M-CK v I-pruhu sarkomery, která byla při permeabilizaci vláken vždy solubilizována. Zároveň zde byla potvrzena interakce CK s adenylátkinasou a aldolasou, což vede k představě funkčního spojení PCr/CK systému s glykolýzou právě v této oblasti (Wegmann et al. 1992).

1.2.3 Lokalizace a funkce mitochondriální isoformy CK

Primární i terciální struktura mitochondriální CK ($_{mt}CK$) je v průběhu fylogeneze vysoce konzervativní (Ellington 2001) a byla nalezena již u prvoústých (Ellington et al. 1998), což svědčí o jejím specifickém významu. Oktamery $_{mt}CK$ se vyskytují mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou a v prostoru krist (Wallimann et al. 1992, Schlattner a Wallimann 2000, Schlattner et al. 2004). Katalyzuje přímou transfosforylaci mitochondriemi produkovaného ATP a cytosolického kreatinu (Cr) na ADP a PCr. ADP vstupuje do prostoru matrix, aby stimulovalo oxidativní fosforylaci, zatímco PCr opouští mitochondrie a vstupuje do cytosolu jako primární vysokoenergetická fosforylovaná komponenta (Jacobus a Leninger 1973).

Molekulární základ takto nasměrovaného metabolického toku vytváří spojení mezi velkým mitochondriálním oktamerem (Schlatner et al. 1998, Schlatner a Wallimann 2000) a dvěma transmembránovými proteiny, adenin nukleotidovým translokátorem (ANT) a napětově závislým kanálem (VDAC - Voltage Gated Anion Channel) (Brdiczka et al. 1994, 1998). Přenos substrátů spojený kreatinkinasou dovnitř a ven z mitochondrií je založen na kolokalizaci, přímé interakci a na difusní bariéře (Vendelin et al. 2004, Saks et al. 2005) následujícím způsobem:

$_{mt}CK$ se pevně váže na kyselý kardiolipin, specifický pro vnitřní mitochondriální membránu, pomocí pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků (lysinu a argininu) na C-terminálním konci své molekuly. Zároveň i ANT je ukotven na kardiolipin což vede ke kolokalizaci a přednostnímu metabolickému toku mezi oběma proteiny v kristách a v intermembránovém prostoru (Schlatner et al. 2004). Omezená propustnost VDAC-kanálu přispívá k $_{mt}CK$ „channellingu“ (viz kap.3) a odděluje ATP „pool“ (Andrienko et al. 2003).

$_{mt}CK$ v tomto prostoru dále interaguje s fosfolipidy vnější membrány a VDAC (Schlatner et al. 2001), tímto je virtuálně spojena vnější a vnitřní membrána a přispívá k mitochondriálním kontaktním místům. Stabilita oktameru a vazby $_{mt}CK$ na membránu je významná pro funkci enzymu a je považována za jeden z důležitých regulačních mechanismů (Schlatner a Wallimann 2000). Oktamery a dimery $_{mt}CK$ jsou v závislosti na experimentálních či fyziologických podmínkách vzájemně konvertibilní (Wyss et al. 1992). V posledních letech se množí důkazy o regulačním významu disociace a reasociace oktamerů pro CK aktivitu *in vivo* (Schlattner a Wallimann 2000).

1.3 Kompartmentalizace substrátů PCr/CK systému

Kompartmenty obecně omezují či usnadňují přístup metabolitů k enzymu. Okolí enzymu, může být tímto způsobem optimalizováno v oblasti hodnot pH, koncentrace iontů, kofaktorů a substrátů, i lokalizace prekursorů enzymu. Kompartmentalizace tedy poskytuje lokální variabilitu těchto faktorů, které regulují aktivitu enzymu (Bessman a Carpenter 1985). Vzhledem k tomu, že existují dobře definované oblasti výskytu v rámci jedné isoformy CK, dá se předpokládat určitá míra kompartmentalizace i jejích substrátů.

O možné kompartmentalizaci nukleotidů na myofibrilách uvažoval již v 60. letech minulého století Perry (1954) a spatřoval v něm velkou výhodu pro přesné nastavení jejich koncentrací nezbytných pro kontrakci. McClellan et al. (1983) popsali dva důležité momenty na permeabilizovaných buňkách. i) adeninové nukleotidy jsou vázané na kontraktilním systému, ii) tyto nukleotidy mohou být refosforylovány v bezprostřední blízkosti kontraktilního aparátu pomocí přenosu fosfátu z PCr. Na druhé straně nepřítomnost nukleotidů maximálně zvyšuje afinitu myosinu k aktinu, bez závislosti na koncentraci Ca^{2+} iontů a způsobuje tak křeč (rigor tension) (Bremel a Weber 1972)

1.3.1 Adeninové nukleotidy

Koncentrace ATP v klidovém kosterním svalu dosahuje hodnot 3-5 mM, zatímco koncentrace ADP není měřitelná enzymatickými stanoveními ani použitím NMR. Proto je obvykle vyvozována z rovnovážné reakce CK a AK, dosahuje hodnoty 0.6 - 50 μM (Levin et al. 1990, Štefl et al. 1994 – **Příloha 2.1**), což je zhruba dvacetina celkového obsahu ADP (Veech et al. 1979). ADP je z 60-80% produkováno myosinovou ATPasou v průběhu kontrakce a většina volného ADP je asociována s myosinem (Hebisch et al. 1986), aktinem a s mitochondriemi (Veech et al. 1979). Okamžité výkyvy ADP jsou pufrovány díky funkčnímu spojení ATPasy s CK reakcí. Toto spojení též předchází disipaci energie způsobené ATP transportem a jeho míšením s rozlehlým okolím (Wallimann et al. 1992, Wyss a Kaddurah-Daouk 2000, Dzeja a Terzic 2003). To nasvědčuje omezování difuze těchto nukleotidů v buňkách, které je kromě myofibrilárního kompartmentu částečně popsáno v subsarkolemálních oblastech (Abraham et al. 2002, Karpen a Rich, 2004, Vendelin et al. 2004). Toto omezení difuze zde umožňuje PCr/CK

systém díky interakci CK se sarkolemou. Byl přímo prokázán úzký funkční kontakt mezi mitochondriemi a iontovými kanály sarkolemy skrze CK systém (Sasaki et al. 2001, Abraham et al. 2002).

1.3.2 Kreatin a fosfokreatin

Kreatin (Cr) je syntetizován v játrech, ledvinách a pankreatu a sekundárně se vyskytuje ve vysokých koncentracích společně s fosforylovanou formou (PCr) v kosterním svalu, srdci a spermatozoích. Následně byl detekován v nižších hladinách v mozku, hnědém tuku, endoteliálních buňkách a makrofázích. Koncentrace celkového kreatinu (PCr + Cr) pozitivně koreluje s aktivitou CK ve zmíněných tkáních s výjimkou místa jeho syntézy, kde je jeho hladina velmi nízká (Wyss a Kaddurah-Daouk 2000).

Koncentrace PCr v klidovém kosterním svalu se pohybuje v rozmezí 12-35 mM, v závislosti na typu svalu a u Cr je 5-10 mM (Ackerman et al. 1980, Chance et al. 1986, Štefl et al. 1994 - **Příloha 2.1**). Degradace Cr i PCr u obratlovců je spontánní neenzymatický proces závislý na pH a teplotě, kdy snížení pH a zvýšení teploty urychluje jeho rozpad na kreatinin (Morrison a Ennor 1960). Proto je hladina kreatinu v kosterního svalu stále doplňována ze zásob v plazmě pomocí kreatinového transportéru (CRT), kterým prochází kreatin symportem s Na⁺ a Cl⁻ ionty. CRT je poměrně pomalý a striktně specifický pro kreatin, tedy netransportuje PCr. Tím je zaručeno kumulování fosforylované formy v buňce i při narušení rovnováhy a zároveň zachování koncentračního gradientu Cr na plazmatické membráně (Walzel et al. 2002).

Autoři, kteří zastávali představu rovnovážné CK reakce, předpokládali jeden společný zásobní „pool“ PCr a Cr ve svalové buňce. Avšak studie s použitím (¹⁴C) Cr podpořily představu oddělených „zásob“ v buňkách srdce a rychlého svalu (Savabi 1988). X-ray-mikronalýzy odhalily vysoce kompartmentalizované fosforylované komponenty (zvláště ATP a PCr) v oblasti I-pruhu a H-zony (LeFugrey et al. 1992), které korespondují s distribucí CK na myofibrile.

2. Význam změny Gibbsovy volné energie (ΔG)

Základním znakem svalu, jako chemomechanického systému je, že Gibbsova energie chemických reakcí je spojena s mechanickým výkonem aktomyosinových motorů. Vstupní chemická energie odpovídá výstupní mechanické síle. Interakce aktomyosinu generují sílu a provádí práci, iontové pumpy provádí elektrickou a osmotickou práci a to vše je závislé na energii dostupné z ATP, která tak spojuje exergonické procesy štěpení ATP s endergonickými procesy buněčné práce (Kushmerick 1994).

Svalové buňky patří mezi jedinečné svojí schopností udržet energetickou rovnováhu, tedy konstantní hladinu ATP, i při o řád zvýšené ATPasové aktivitě během kontrakce (proti klidové). Maximální rychlost štěpení ATP myosinovou ATPasou je $1,4 \text{ mM s}^{-1}$ (Kushmerick a Davies 1969). Ve většině svalů je kapacita regenerace ATP pomocí PCr/CK systému velmi vysoká a jednoznačně přesahuje rychlost utilizace ATP stejně jako jeho doplňování ox fosforylací nebo glykolýzou (McGilvery a Murray 1974). Např. maximální rychlost syntézy ATP skrze CK reakci je v krysím srdci 30 mM.s^{-1} a je řádově vyšší než rychlost syntézy ATP oxidativní fosforylací (2.5 mM.s^{-1}) nebo *de novo* (0.39 mM.s^{-1}) (Bittl a Ingwall 1985, Ingwall et al. 1990).

I když je CK aktivita ve směru syntézy ATP dostatečně vysoká, aby pokryla požadavky myosinové ATPasy, provedené simulace indikují krátkodobé vychýlení z rovnováhy při kontrakci. Poměr CK aktivity ve směru syntézy ATP a hodnoty aktivity v opačném směru reakce, během kontrakce, je 1.03. To představuje posun koncentrací jen o několik procent. Změna Gibbsovy volné energie o 1.8 kJ mol^{-1} , představuje změnu poměru koncentrací substrátů na dvojnásobek. Z toho vyplývá že posun od rovnováhy má nepatrné energetické důsledky (Kushmerick 1998).

Skutečnost, že při velice proměnném obratu ATP ve svalové buňce zůstává CK reakce blízko rovnováhy, znamená, že ΔG je velice malá. ΔG musí mít stejný význam pro řízení CK reakce *in vivo* v buňce jako ve zkumavce *in vitro*. Na rozdíl od zkumavky, kde je v podstatě postačující podmínkou, je v buňce samovolný vliv změny koncentrace substrátů (měnící poměr reaktantů a produktů) malý, aktivita je zde pod vlivem lokálních změn pH, iontového složení, konformačních změn a ostatních regulačních mechanismů působících v buňce. Jde o obecně

platný poznatek důležitý pro řízení enzymatické reakce. Tedy, že samotná nabídka reaktantů v buňce není postačující ke stimulaci enzymatické reakce.

Předpokladem pro stimulaci toku (flux) CK reakce v kterémkoliv z obou směrů, je velice malé ΔG , a pouze „mírné“ vychýlení z rovnováhy. Kolik znamená „mírné“ vychýlení v kosterním svalu, je otázka. Toky měřené jako PCr pokles a recovery jsou v čase exponenciální (Meyer 1988). Oba časové průběhy však nejsou přesně zrcadlově stejné, rozpad a recovery PCr mají odlišné časové konstanty. Tato asymetrie je patrná z časových průběhů a může být kvantifikována časovým průběhem změny koncentrace PCr (Kushmerick 1998).

Na úrovni orgánového řízení může být rovnováha vychýlena změnou průtoku krve (médiu). Zvýší-li se v izolovaném kosterním svalu průtok otevřeným nutritivním řečištěm (za současné superfuse médiem s nízkým pO_2 a perfuse s vysokým pO_2) stoupá spotřeba kyslíku a produkce tepla úměrně s průtokovou rychlostí.

Během metabolismu stimulovaného průtokem:

1. ^{31}P NMR spektroskopie prokázaly současný vzrůst koncentrací ATP a PCr (jev označený v termodynamice jako propagace chemického potenciálu) namísto transformačních změn obou substrátů blízko rovnováhy v klidu a při kontrakci (Mejsnar et al. 1992).
2. Energetický stav svalů (vyjádřený jako „kreatinový náboj“, což je poměr koncentrací PCr a totálního kreatinu : Cr charge = $[PCr]/([PCr] + [Cr])$) a ΔG hydrolysy ATP : $\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln [ATP]/([ADP] + [Pi])$ a steady ATP turnover stoupají při nezměněném poměru ATP/ADP (Štefl et al. 1994 - **Příloha 2.1**, Janovská et al. 1999).
3. Produkce laktátu se nemění, nicméně poměr anaerobní syntézy k aerobní syntéze ATP stoupá s perfusní rychlostí z poměru 69:31% na 34:66% (Štefl et al. 1999).

3. Přednostní metabolický tok neboli „substrate channelling“

Původní fyziologické experimenty zkoumající vliv zátěžových situací na koncentraci makroergních fosfátů u ischemického srdce (Gudbjarnason et al. 1970) i únavy kosterního svalu ukázali, že hladina ATP klesá minimálně, ale deplece PCr přímo koreluje se zastavením srdce či projevem únavy u kosterního svalu. U žabího srdce následná reperfuse s kreatinem vedla k obnovení kontraktility (Vassort a Ventura-Clapier 1977). Tato data ukazují na závislost kontraktilní funkce na PCr/CK systému a zároveň na limitovaný přístup ATP k ATPasám ve svalu; a zároveň vypovídají o existenci přednostního metabolického toku od myofibrilární CK k myosinové ATPase, i když v tu dobu nebyl takto popsán. Později byl podobný fenomén pozorován i u jiných enzymatických systémů a byl nazván „metabolic channelling“ či „substrate channelling“ (SCH). Byl definován jako přímý přenos reakčního produktu mezi aktivními místy dvou enzymů katalyzujících následné reakce jedné metabolické dráhy, kdy nedochází k uvolnění reakčního produktu do okolního roztoku (Srere 1987, Ovadi 1991, Anderson 1999). Obecně tedy snižuje tranzitní časy substrátů, ztráty neusměrněnou difusí a únik substrátů do kompetitivních metabolických drah (Spivey a Ovadi 1999).

Další kinetická úvaha pochází z experimentů provedených na ATPasové aktivitě. Na izolovaných srdečních myofibrilách, kde je CK přirozeně vázána, byla naměřena rovnovážná konstanta pro ATP 80 μM v nepřítomnosti PCr a po jeho přidání klesla na hodnotu 14 μM . Přítomnost samotné exogenní CK nezpůsobila tak velký posun rovnovážné konstanty, což ukazuje na mimořádný význam lokalizace CK v myofibrilární struktuře pro maximální účinnost myosinové ATPasy (Krause a Jacobus 1992). Současně se zdají být kinetické vlastnosti samotné myosinové ATPasy velmi ovlivněny myofibrilární strukturou na rozdíl od myofibrilární CK (Dowell a Fu 1992).

Z uvedených dat vyplývá úzká souvislost přímého toku metabolitů s intracelulárními strukturami, kde se enzymy přirozeně nacházejí buď jako jejich přímá součást (myosinová ATPasa) nebo v asociované formě (CK).

Jak tedy vysvětlit funkční spojení dvou enzymů? Pro myofibrilární kompartment může být přímá interakce mezi myosinovou ATPasou a CK vyloučena ze dvou důvodů: prvním je stechiometrický poměr 1:10 mezi CK a ATPasou a detailní morfologická data uvádějí, že oblast myosinových hlav je prosta CK aktivity (Wegmann et al. 1992). Závislost „substrate

channellingu“ na prostorovém uspořádání enzymů byla popsána pro CK a hexokinasu (HK), které byly ko-imobilizované na sefarovém podkladu. Když tyto dva enzymy byly odděleny vzdáleností menší než 10 nm vytvářely funkční kompartment, kde měla HK preferenční přístup k ATP formovanému CK reakcí (Fossel a Hoefeler 1987). Avšak vzdálenost myosinové hlavy je větší než 10 nm. Pro CK molekuly a myosinové ATPasy bylo modelováno funkční spojení ko-imobilizací na umělé membráně. Arrio-Dupot (1988, 1992) popsal „channelling“ ADP od ATPasy k CK. Současně uvádí, že přímý přenos ATP mezi myofibrilární CK a myosinovou ATPasou předpokládá přítomnost nemísitelné vrstvy v myofibrilární cytoarchitektuře, založené na elektrostatických interakcích (Arrio-Dupot 1988, 1992). Nemísitelná vrstva reprezentuje mikrokompartment, ve kterém je lokální koncentrace intermediárních substrátů a produktů odlišná od většiny okolního roztoku. Tím jsou vytvořeny výhodnější reakční podmínky pro druhý enzym, i když nejsou tyto dva enzymy v těsné blízkosti.

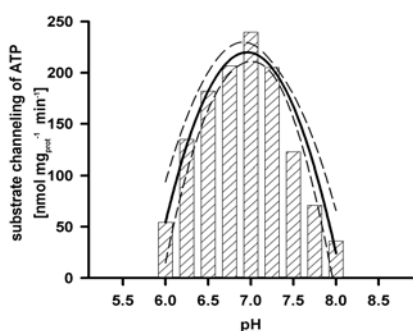
Mechanismem uvedeného přímého přenosu je elektrostatický přenos reakčního intermediátu („electrostatic channelling“). Tento princip se uplatňuje u molekul, jejichž uspořádání neumožňuje vnik intramolekulárního tunelu a byl popsán RTG difrakční analýzou krystalu bifunkčního enzymového homodimeru z *Leishmania major*. Negativně nabitý dihydrofolát se pohybuje podél kladně nabitého povrchu enzymu mezi aktivními místy dihydrofolátreduktasy a thymidylátsynthasy, vzdálenými 40 Å (Knighton et al. 1994, Stroud 1994). Hypotézu elektrostatického transportu reakčního intermediátu podporuje přítomnost konzervativních kladně nabitých aminokyselinových zbytků na povrchu monofunkční dihydrofolátreduktasy a thymidylátsynthasy (Stroud 1994, Elcock et al. 1996). Předpokládá se, že na podobném principu funguje přímý přenos reakčního produktu mezi aldolasou a glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasou (Ouporov et al. 2001).

Jako další mechanismus je popsána existence hydrofobního intramolekulárního tunelu v molekule tryptofansynthasy (Hyde et al. 1988). Tryptofansynthasa je modelovým příkladem přímého přenosu reakčních produktů v rámci jedné molekuly enzymu, tvořeného několika podjednotkami, který spojuje aktivní místa enzymů. Intramolekulární tunel je za klidového stavu přístupný pro okolní vodní fázi, ale po navázání substrátu se vlivem konformačních změn uzavírá. Přenos tunelem je velmi rychlý, samotná reakce je rovněž velmi rychlá a reverzibilní. Vazba substrátu do jednoho místa zvyšuje aktivitu druhého aktivního místa (Dunn et al. 1990, Lane a Kirschner 1991, Anderson et al. 1991). Do této kategorie přímého přenosu reakčních

produktů patří rovněž zmíněný mitochondriální komplex ANT/mtCK/VDAC (Brdiczka et al. 1994, Wyss et al. 1992).

3.1 Fyziologický význam „substrate channelling“

Hlavním významem přímého přenosu reakčních produktů v rámci PCr/CK systému je funkční spojení míst produkce a spotřeby energie a jejich integrace v jednom regulačním systému. Fyziologické důsledky tohoto funkčního spojení jsou podrobněji vysvětleny v kap. 1. Fyziologický význam PCr/CK systému.



Obr.2 Závislost substrate channellingu na pH je popsána kvadratickou funkcí (plná linie), která má maximum v hodnotě pH 6,95. Přerušované line zobrazují interval ve kterém leží 95% hodnot. (Gregor et al. 2003)

Fyziologický význam fenoménu "substrate channelling" pro řízení energetického metabolismu ve svalových buňkách dokládají práce dokumentující dynamiku jeho rozsahu v závislosti na měnících se podmínkách při kontrakci (Kaasik et al. 2001, Gregor et al. 2002). Formou přímého přenosu je transportováno kolem 50 % ATP mezi MM-CK a myosinovou ATPasou v kosterním svalu (Gregor et al. 1999 – **Příloha 2.2**). Ukazuje se, že buňka dokáže změnit podíl přímo přenášených substrátů tak, aby optimalizovala distribuci energie do míst s největšími

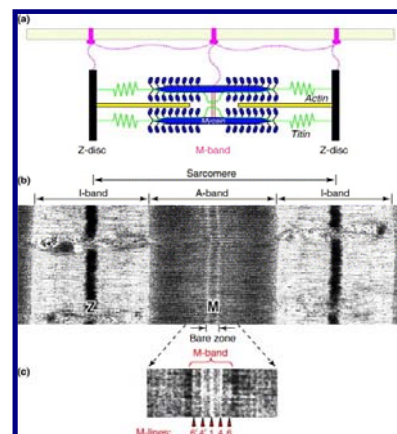
energetickými nároky. Podíl "substrate channelling" je nejvyšší v případě poklesu pH (obr. 2), který je charakteristický pro déle trvající svalovou kontrakci (Gregor et al. 2002 – **Příloha 2.3**). Snížení pH vede k poklesu ΔG hydrolyzy ATP a jeho přednostní transport nadále energeticky zajišťuje hlavní funkci svalové buňky. V této souvislosti je nutné rovněž zmínit roli druhého významného regulačního systému energetického metabolismu - AMP aktivované proteinkinasy. Tento enzym je metabolickým senzorem, který udržuje v rovnováze anabolické a katabolické pochody v buňce (Winder 2001). V okamžiku zvýšených energetických nároků aktivuje dráhy energii produkující a inhibuje dráhy energii spotřebovávající. Jedním z enzymů, které jsou AMP aktivovanou proteinkinásou inhibovány, je kreatinkinasa (Ponticos et al. 1998). Význam této inhibice např. při déle trvající svalové kontrakci není úplně jasný. Kaasik se spolupracovníky popsal vzájemnou zastupitelnost PCr/CK systému a přímého přenosu ATP z mitochondrií k myosinové ATPase ("interorganellar substrate channelling"). Inhibice PCr/CK systému vyvolá

zvýšení přímého toku ATP z oxidativní fosforylace do míst jeho spotřeby. Znamenalo by to, že za těchto podmínek volí buňka efektivnější způsob transportu energie. Zároveň však není možné vyloučit, že *in vitro* dochází pouze ke zvýšení podílu přímého přenosu ATP mezi isoenzymy CK a asociovanými molekulami (Kaasik et al. 2001).

4. PCr/CK systém v M-linii sarkomery

4.1 Sarkomera jako nejmenší funkční jednotka

Kontrakce a relaxace kosterního svalu je realizována posuvem kontraktilních filament v jednotlivých sarkomerech. Sarkomera ve fyziologické délce (cca 2.2 μm) vykazuje v elektronovém mikroskopu (obr.3) tři základní široké pruhy, jeden A (anizotropní) a dvě poloviny I (izotropního) pruhu. A-pruh je tvořen převážně silnými filenty myosinu a v jeho střední části bez myosinových hlav v H-pruhu, tvořeného lehkým meromyosinem (LMM), můžeme pozorovat několik tmavých linií. Počet těchto M-linií se liší podle typu svalu a u některých svalů není patrný (Sjostrom a Squire 1977, Andrade et al. 2003). I-pruh obsahuje převážně tenká filamenta aktinu (včetně regulačních proteinů) a je rozdělen na dvě poloviny tmavou tenkou Z-linií. Zatímco silná (myosin) a tenká (aktin) filamenta mají za úkol generovat sílu při svalové kontrakci, jiné strukturální proteiny přispívají k jejich nejvhodnějšímu prostorovému uspořádání a tím zajišťují maximální účinnost jejich funkce, a současně se účastní signalizačních procesů.



Obr. 3 Sarkomera. a) schema základního proteinového složení : myosinová filamenta (modře), aktinová filamenta (žlutě), titin (zeleně), spojení se sarkolemou (růžově). b) zobrazení sarkomery a c) detailu M-linie pomocí elektronové mikroskopie (TEM).

Tyto strukturální proteiny jsou převážně organizovány v okrajových příčných strukturách sarkomery v Z-liniích, kde upevňují tenká filamenta a vymezují délku sarkomery; a ve středu sarkomery v M-linii, kde zajišťují organizaci myosinových filament. Významnou úlohu ve vývoji a organizaci myofibril mají tři cytoskeletální proteiny, které jsou příbuzné superrodině imunoglobulinu (Bantle et al. 1996): obscurin (800 kD), nebulin (800 kD) a samotný titin (2-3 MD). Mají podobnou strukturu – tvoří je dvě základní oblasti: adhesivní modul a signální domény (Obermann et al. 1997, 1998, Russell et al. 2002.). Na C-terminálním konci obsahují násobný fosforylační motiv pro ERK kinasy.

Význam a lokalizace těchto proteinů se liší. Obscurin přiléhá těsně v oblasti M- a Z-linie sarkomery, kde plní organizační i signalizační funkci (Kontogianni-Konstantonopolus et al. 2003, 2004). Nebulin reguluje délku aktinových filament (Horowitz 2006) společně

s tropomodulinem, který zakončuje tenká filamenta ve střední části sarkomery (Fischer a Fowler 2003). Největším proteinem je titin, jehož dlouhá molekula (1 μm) spojuje M- a Z-linii a tím stabilizuje myosinová filamenta ve střední části sarkomery, kde se jeho dvě molekuly spojují překrytím svých C-terminálních konců (Gregorio et al. 1999, Granzier a Labeit 2002, Tskhoverbova a Trincik 2003). Titin zajišťuje klidové napětí svalu a signalizační funkce a v tomto ohledu jsou významná fosforylační místa na N- a C- konci obrovské molekuly, která spadají do oblastí Z- a M-linie (Gautel et al. 1993).

Z uvedených prací vyplývá, že právě přes tyto dvě příčné linie M a Z prochází signály k bazální lamině a k ECM (Pardo et al. 1983, Danowski et al. 1992) a jsou tedy významnými regulačními oblastmi sarkomery v období vývoje a ve zralém svalu.

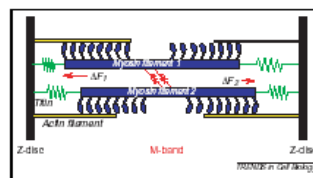
4.2.1 Význam M-linie sarkomery

Lokalizace M-linie ve středu A-pruhu určuje její význam v organizaci myosinových filament a zároveň důležitou úlohu při myofibrilogenezi, kdy jsou silná filamenta uspořádávána do typické hexagonální struktury (Knappeis et al. 1968).

První autoři uvažovali úlohu M-linie v regulaci příčné pozice myofilament a rostoucí tloušťky myofibril v průběhu kontrakce, která ovšem byla později experimentálně vyloučena. Bobtnání svalu při zkrácení tedy nesouvisí se změnou prostorového uspořádání myosinu a aktinu, ale s cytosolem (Millman 1998).

Druhou možností se nabízela ochrana podélného uspořádání silných filament při kontrakci, kdy dochází k destabilizaci jejich pozice a dislokaci A-bandu (Patel a Lieber 1998, Agarkova et al. 2003). Horowitz et al. (1989) v tomto případě přisuzovali nejdůležitější roli titinu, jehož jedna dlouhá molekula (cca 1 μm) spojuje M-linii se Z-linií sarkomery a zároveň vytváří různé funkční isoformy dle typu svalu (Kenny et al. 1999, Obermann et al. 1997). Tento názor diskutují autoři Agarkova et al. (2003) a jednoznačně přisuzují stabilizační funkci M-linii, která naopak napomáhá obrovskému titinu v aktivované sarkomeře.

Vzniká tak třetí představa o tom, že struktura M-linie vyrovnává možnou nerovnováhu sil působících od střední části sarkomery v opačném směru. Zajišťuje tedy rovnoměrné rozložení sil a symetrické zkrácení sarkomery a tím zároveň brání její možné deformaci (Agarkova et al. 2003) (obr. 3).



Obr. 3 Možná deformace sarkomery protisměrným působením sil při kontrakci, v případě nestabilní M-linie. (Agarkova et al. 2003)

Asociace enzymů energetického metabolismu v M-linii a existence přednostního energetického toku směrem k myosinové ATPase (viz kap. 3) svědčí o jejím významu v energetice kontrakce. Přítomnost vázané kreatinkinasy byla poprvé dokumentována již před více než 30 lety (Turner et al. 1973, Stolz a Wallimann 1998), ale asociace enolasy, fosfofruktokinasy a adenylátkinasy byla potvrzena relativně nedávno (Keller et al. 2000, Lange et al. 2002).

Signalizační význam M-linie je možné odvodit z recentních prací, které přinášejí nové nálezy proteinů asociovaných v M-linii. Z rodiny LIM proteinů byl identifikován DRAL/FHL-2 i zde kromě I-pruhu. (LIM proteiny obsahují LIM doménu, která obsahuje zhruba 30 aminokyselinových zbytků se dvěma Cys a His zbytky vázajícími Zn^{++} atom ve svém středu, tzv. „zinc finger motif“. LIM proteiny se uplatňují v buněčných strukturách převážně jako „lešení“ (Bach 2000)) Lange et al. (2002) přepokládají spojení DRAL/FHL-2 s CK a s ostatními metabolickými enzymy vyskytujícími se v této oblasti. Na základě prokázané interakce DRAL/FHL-2 proteinu s jadernými faktory (jako promyelocytic leukemia zinc finger protein) a androgenními receptory, je mu přisuzována úloha v jaderné signalizaci (Muller et al. 2000, McLoughlin et al. 2002).

Další identifikované proteiny jsou z rodiny „RING finger“, MURF1 a MURF 2, které mohou zprostředkovávat signalizaci přes dráhu glukokortikoidu (MURF1) a nebo buněčného stresu (MURF2) (McElhinny et al. 2002, Pizon et al. 2002). Současně byl prokázán jejich význam v myogenesi a stabilizaci mikrotubulů společně s MURF3 (Gregorio et al. 2005). Všechny zmíněné formy MURF asociují s titinem v oblasti M-linie. MURF1 a MURF2 jsou spojovány též s ubikvitinilací proteinů (Witt et al. 2005) a oxidovaná forma MM-CK byla prokázána jako specifický substrát pro MURF1 (Zhao et al. 2007). Autoři zde poukazují na možný mechanismus

degradace cytosolické CK, vazbou na MURF1 a následnou ubikvitinilaci, zajišťující její obrat v buňce, který je spojený s oblastí M-linie sarkomery.

V současnosti stále není jasné zda je M-linie integrována s laterální membránou srovnatelným způsobem jako Z-linie, avšak existence takového spojení je žádoucí už jen z uvedeného pohledu stability sarkomery. Transverzální spojení M-linie s membránou bylo vizualizováno, ale jeho molekulární složení ještě není zdaleka kompletní (Pierobon-Bormioli 1981, Wang a Ramirez-Mitchell 1983). Skelemin jako součást M-linie, byl původně považován za spojku hranice M-linie a intermediálních filament (Price a Gomer 1993). Avšak skelemin je ve skutečnosti varianta sestříhu myomesinu (Steiner et al. 1999) a proto byl přejmenován na EH-myomesin (Agarkova et al. 2000). Poměrně nedávno bylo zjištěno, že spojení s membránou by mohl zastávat spektrin společně s asociovanými proteiny (Williams a Bloch 1999, Flick a Konieczny 2000). Tomu napovídá skutečnost, že ankyrin, který interaguje s erytrocitárním spektrinem, byl též nalezen na membráně na úrovni M-linie společně s obscurinem (Bagnato et al. 2003). Současně byla prokázána přímá interakce obscurinu s malým ankirinem 1 (Kontogianni-Konstantopoulos et al. 2003); tento multifunkční adaptorový protein zde zprostředkovává přímou interakci mezi proteiny sarkomery a sarkoplasmatického retikula.

Z uvedených informací vyplývá, že oblast M-linie je dobrým kandidátem na sensor mechanické zátěže sarkomery během kontrakce, který je spojený se signalizačním systémem směrem ven přes membránu k ECM i směrem do nitra svalové buňky do jádra či k jiným organelám.

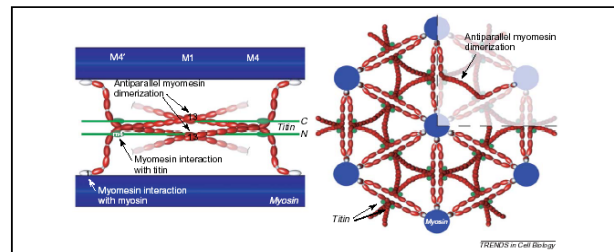
4.2.2 Interakce strukturálních proteinů v M-linii

Na rozdíl od I-pruhu, který je poměrně dobře prostudován, je v oblasti A-pruhu a M-linie dosud identifikováno pouze několik základních proteinů a objevují se první signální molekuly, které byly uvedeny v předešlé kapitole v kontextu jejich funkce .

M-protein (165 kD) byl charakterizován poměrně brzy (Masaki a Takaiti 1974, Trinick a Lowey 1977) a lokalizován pomocí polyklonálních protilátek (Strehler et al. 1983). Myomesin

(185 kD) byl objeven jako kontaminace při purifikaci M-proteinu (Grove et al. 1984) a trvalo dalších 10 let než byl charakterizován na molekulární úrovni Obermannem (1995). Současně u již známého titinu (dříve connectin) byla prokázána vazebná schopnost s oběma proteiny – myomesinem i M-proteinem (Nave et al. 1989, Vinkemeier et al. 1993) v oblasti M-linie, kdy interakce myomesinu s titinem je závislá na přítomnosti fosfátu (Obermann et al. 1997). Struktura titinu byla souhrnně popsána Labeitem a Kolmererem (1995) a do oblasti M-linie zasahuje jeho část C-terminálního konce (250 kD), která v blízkosti M1-linie obsahuje doménu titinkinasy (Obermann et al. 1997).

V centrální M1-linii je pozorován též myomesin, u kterého dochází k antiparalelní dimerizaci jeho dvou protilehlých molekul procházejících až k oblastem M4 a M4' můstkům (obr 4). V tomto místě dochází k jeho interakci s myosinem (Lange et al. 2005). Tento model ukazuje, že stejně jako α -aktinin spojuje tenká filamenta v Z-linii (Young et al. 2001) do tvaru sítě, tak myomesinové dimery spojují silná filamenta v M-linii.



Obr. 4 Dimerizace myomesinu v M-linii v oblasti M1 až M4 (M4') můstků. Podélný (vlevo) a příčný pohled (vpravo). Myosinová filamenta jsou zobrazena (modře), myomesin (červeně) a titin (zeleně). (Lange et al. 2005)

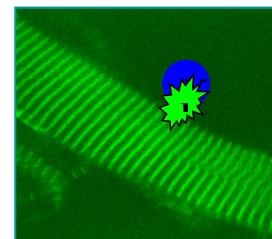
Myosin vázající proteiny (MyBP) vyskytující se v M-linii či její přímé blízkosti, byly pomocí cDNA zařazeny do nové rodiny proteinů (pro přehled Furst a Gautel 1995), která je charakteristická dvěma doménami imunoglobulinu „Ig-like“ a doménou typu fibronektinu III „(Fn)-like domain“. Patří sem: titin (Labeit a Kolmerer 1995), myomesin a M-protein (Vinkemeier et al. 1993), myosin vázající C-protein (MyBP-C) a H-protein (Vaughan et al. 1992, Bennet et al. 1986). MyBP-C byl lokalizován v A-pruhu po obou stranách M-linie u psoasu králíka (Craig a Offer 1976) a je známa jeho fosforylace prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinasy v kosterním svalu a při β -adrenergní stimulaci v srdci (Lim a Walsch 1986).

Myofibrilární CK byla popsána jako strukturální součást M4 M4' můstků M-linie sarkomery (Strehler et al. 1983), která je důležitá pro sestavení a stabilitu myosinových filament v sarkomeře (Luther et al. 1980, Thornell et al. 1987).

4.2.3 Interakce CK v M-linii sarkomery

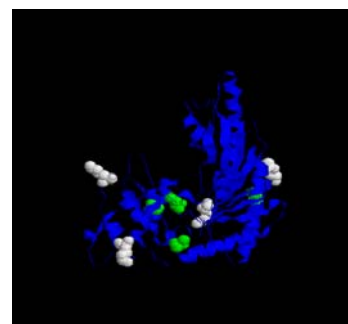
Znalost primární struktury proteinů M-linie a technický rozvoj umožnily výrobu specifických protilátek proti jednotlivým epitopům a zároveň testování specifických interakcí metodami „Surface plasmon resonance“ (SPRC) a „Two-yeast hybridization“. Tento rozvoj umožnil detailní studium interakce CK v M-linii, ale některé funkční otázky zůstávají stále nezodpovězeny, např. zda tato interakce souvisí s aktivitou enzymu a pokud ano, tak jak.

Kreatinkinasa, jak bylo řečeno, je strukturální součást M4 M4' můstků M-linie sarkomery a lze ji vyjmout pomocí specifických monovalentních protilátek (Wallimann et al. 1977) a následně ji znovu navázat v případě neporušené struktury silných filament (Bahler et al. 1985). Je možné ji extrahovat pomocí nízkoiontového (bezvápníkového) media a následně znovu navázat do struktury (Ventura-Clapier et al. 1987) nebo vytěsnit z permeabilizovaných vláken či izolovaných myofibril použitím vyšší koncentrace exogenní kreatinkinasy (Obr. 5) (Kraft et al. 1998, Žurmanová et al. 2007 – **Příloha 2. 4**).



Obr. 5 Izolované myofibrily s vytěsněnou endogenní CK v M-linii pomocí exogenní CK (modrá) fluorescenčně značené konjugací (IAF) iodacetamid-fluoresceinem (zeleně). (CK-IAF) (nepublikovaný obrázek)

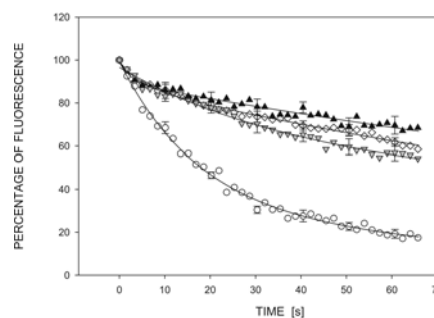
Výsada vazby v M-linii přísluší pouze MM-cytosolické CK isoformě a je realizována N-koncovou částí každého monomeru této molekuly (Stolz a Wallimann 1988). Porovnáním primárních struktur identifikovali Hornemann et al. (2000) dva páry lysinových zbytků, které jsou vysoce konzervativní v M-CK isoformě a nejsou přítomny ve struktuře B-CK. Pomocí chimér M-a B-CK potvrdily, že oba páry se účastní interakce, přičemž první pár na velké doméně CK (K104/115) vytváří silné vazebné místo a druhý pár (K8/K24) se váže slabě (obr.6). O tři roky později, ve stejné laboratoři, autoři navrhli tři kandidáty na přímé vazebné partnery M-CK v M-linii: M-protein, myomesin a titin a testovali jejich vybrané fragmenty. Byla prokázána interakce M-CK s myomesinem a M-proteinem a interakce CK s titinem



Obr. 6 Monomer M-CK s vyznačenými páry Lys zbytků (K104/115) a (K8/K24) (bílá) a s florescenčně (IAF) značenými 4 Cys zbytky (zelená). (Autor obr. D. Maláčová)

potvrzena nebyla. Zároveň byla zaznamenána pH závislost této protein-proteinové interakce (Hornemann et al. 2003).

Studium interakce fluorescenčně značené CK (obr. 6) s izolovanými myofibrilami potvrdilo pH závislost této vazby na vyšší strukturální úrovni (**Příloha 2.4**) ve shodě s výsledky získanými na úrovni protein-proteinových interakcích (Hornemann et al. 2003). Současně byla zjištěna nutná přítomnost substrátů kreatinkinasy pro silné navázání enzymu do struktury myofibril a plnění její známé strukturální funkce. V nepřítomnosti substrátů v oblasti mírně alkalického pH kreatinkinasa vykazuje dynamický stav asociace a disociace, kdy v průběhu 1 min dojde k výměně veškeré CK vázané v M-linii (Žurmanova et al. 2007 - **Příloha 2.4**). Zesílení vazby v přítomnosti substrátů může být indukováno konformační změnou CK molekuly při jejich navázání (Mejsnar et al. 2002). Současně může docházet k autofosforylaci kreatinkinasy (Stolz et al. 2002) a nebo k fosforylaci jiných vazebných partnerů kreatinkinasy v M-linii. V úvahu připadá i fosforylace titinu, který však nebyl prokázán přímým vazebným partnerem CK, ale mohl by ovlivnit vazbu přes interakci s myomesinem (Obermann et al. 1997).



Obr.7 Pokles intenzity fluorescence v M-linii sarkomery, který odpovídá výměně molekul CK-IAF v čase, měřený metodou FLIP. (●), (○) a (□) reprezentují pokles int. fluorescence CK-IAF molekul s navázanými substráty, který se neliší od kontroly (nevedeno) ($P < 0,05$). (○) reprezentují pokles int. fluorescence CK bez substrátů, který se liší od CK-IAF se substráty ($P < 0,05$). Uvedené hodnoty jsou průměry \pm S.E.M. ($n=6$)

4.2.2 Variabilita M-linie dle typu svalu

Struktura a proteinové složení M-linie se průkazně mění v souladu s typem inervace kosterního svalu, tedy zda jsou vlákna inervována pomalými či rychlými motoneurony, zatímco ostatní parametry jako trvání kontrakce, šíře Z-linie a mitochondriální obsah je variabilní mezi jednotlivými svaly dolní končetiny, bez přímé závislosti na typu inervace a tedy na typu svalu (Thornell et al. 1987).

Ve centru sarkomery můžeme pomocí EM pozorovat pět densních linií M1, M4/M4' a M6/M6' (Sjostrom a Squire 1977) v šíři zhruba 75 nm. Výskyt M-linií přímo koreluje s typem svalu, jak bylo řečeno, a mění se v průběhu vývoje. Obecně v nejrychlejších svalech můžeme pozorovat tři linie, zatímco nejpomalejší má linie čtyři. Mezistupeň je tvořen pěti liniemi (Sjostrom a Squire 1977, Carlsson a Thornell 1987). Obraz M-linie v srdci odpovídá srdeční frekvenci u jednotlivých druhů (Pask et al. 1994). Zároveň se profil M-linie mění v průběhu vývoje, např. M1 střední linie zmizí během prvních dvou týdnů vývoje u pomalých svalů (Carlsson a Thornell 1987).

V superrychlém extraokulárním svalu M-linie není pozorovatelná a byly zjištěny velké metabolické odlišnosti od typických kosterních svalů dolní končetiny. Snížená exprese proteinů M-linie má za následek zvýšenou elasticitu a sníženou sílu kontrakce (Andrade et al. 2003, Wiesen et al. 2007). To odpovídá skutečnosti, že M-linie je dynamická struktura reagující na změnu kontraktálních parametrů. Agarkova et al. (2003) uvádějí, že suma všech isoformů myomesinu (to je též M-protein) je proporcionální množství těžkých řetězců myosinu ve všech typech svalu. Autoři dokumentují vzájemně se měnící poměr M-proteinu a myomesinu v závislosti na typu svalu. Myomesin je univerzálním proteinem M-linie a objevuje se brzy asociován s myosinem ve všech typech kosterního i srdečního svalu, zatímco M-protein byl detekován pouze v kosterním rychlém a srdečním svalu a objevuje se až v pozdějších vývojových stádiích (Grove et al. 1985, Carlsson et al. 1990). M-protein může napomáhat větší stabilizaci silných filament u svalů s rychlým rozvojem síly (Pask et al. 1994), naproti tomu myomesin dává filamentům vyšší stupeň elasticity (Agarkova a Perriard 2005).

Množství CK u jednotlivých typů svalů se liší, u rychlých glykolytických vláken je obsah signifikantně vyšší než u pomalých oxidativních svalů (Ventura-Clapier et al. 1995). V extraokulárním svalu je její celková exprese silně snížena společně se strukturálními proteiny M-linie (Andrade et al. 2003).

SOUHRN VÝSLEDKŮ

Výsledky disertační práce jsou obsaženy ve čtyřech následujících článcích, publikovaných nebo zaslanych k publikaci v „peer reviewed“ odborných časopisech.

(1) Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. (Štefl et al. 1994)

Práce zavedla metody měření metabolitů PCr/CK systému a kvantifikovala energetický stav kosterního svalu potkana: i) izolovaného pomocí metody „freeze clamping“ ii) po vaskulární izolaci iii) po regeneraci, současně perfundovaného a superfundovaného médiem. Hladina makroergních fosfátů v anoxii i po perfusi poklesla, avšak kreatinový náboj $[PCr]/([PCr]+[Cr])$ dosáhl stejné hodnoty u perfundovaného-superfundovaného svalu vzhledem ke kontrole („freeze clamped“). Konstantní kreatinový náboj indikuje zachování rovnovážného energetického stavu u izolovaného perfundovaného-superfundovaného m. gracilis.

(2). Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibres and their myofibrils. (Gregor et al. 1999).

Práce shrnuje experimentální data měření kreatinkinasové aktivity v různě připravených permeabilizovaných svalových vláknech a izolovaných myofibrilách. Stanovování enzymatické aktivity v myofibrilární frakci bylo zaměřeno na fenomén přímého přenosu ATP mezi myofibrilární kreatinkinase a myosinovou ATPasou, ke kvantitativnímu posouzení úniku ATP jako produktu kreatinkinasové reakce. Výsledky představují výchozí bod pro další studium PCr/CK systému a funkce kreatinkinasy na molekulární a biochemické úrovni v integritě svalového vlákna, respektive myofibrily.

(3). Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH. (Gregor et al. 2002)

Hodnoty kreatinkinasové aktivity v myofibrilární frakci určují míru přímého přenosu ATP mezi CK vázanou v M-linii sarkomery a myosinovou ATPasou, publikované v prvním článku (Gregor et al. 1999). Stanovení závislosti rozsahu "substrate channelling" ATP na pH ukazuje na možnost regulace podílu přímo přenášených substrátů *in vivo* tak, aby v buňce byla optimalizována distribuce energie do míst s největšími energetickými nároky.

(4) Creatine kinase binds more firmly to the A-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates. (Žurmanová et al. 2007)

Čtvrtá část projektu se soustředila na interakci CK s izolovanými myofibrilami. Byla potvrzena vazba fluorescenčně značené CK v A-pruhu (dle lit. údajů v M-linii) sarkomery. Použitím konfokální mikroskopie s metodou FLIP, doplněnou o stanovení přítomnosti CK aktivity na myofibrilách, byla zjištěna silná pH závislost, která je v interpretační shodě s výsledky přímého přenosu metabolitů mezi CK a myosinovu ATPasou (Gregor et al. 2002). Současně bylo prokázáno, že přítomnost CK substrátů posiluje vazbu CK v M-linii myofibrily. Tato silná vazba je nezbytná k plnění strukturální funkce CK v M-linii sarkomery a velmi pravděpodobně i k realizaci přednostního metabolického toku mezi CK a ATPasou, tedy k řízení CK reakce v tomto kompartmentu.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abraham, M. R., Selivanov, V. A., Hodgson, D. M., Pucar, D., Zingman, L. V., Wieringa, B., Dzeja, P. P., Alekseev, A. E., Terzic, A. (2002). Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing. Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out. *J. Biol. Chem.*, 277(27):24427-34.
- Ackerman, J. J., Grove, T. H., Wong, G. G., Gadian, D. G., Radda, G. K. (1980). Mapping of metabolites in whole animals by ³¹P NMR using surface coils. *Nature*, 283(5743):167-70.
- Agarkova, I., Auerbach, D., Ehler, E., Perriard, J. C. (2000). A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J. Biol. Chem.*, 275:10256–10264.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R., Perriard, J. C. (2003). M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 24:191–203.
- Agarkova, I., Perriard, J. C. (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.*, 15(9):477-85.
- Anderson, K. S., Miles, E. W., Johnson, K. A. (1991). Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism. *J. Biol. Chem.*, 266:8020-8033.
- Anderson, K. S. (1999). Fundamental mechanisms of substrate channeling. *Methods Enzymol.*, 308:111-145.
- Andrade, F. H., Merriam, A. P., Guo, W., Cheng, G., McMullen, C. A., Hayess, K., Ven, P. F. van der, Porter, J. D. (2003). Paradoxical absence of M lines and downregulation of creatine kinase in mouse extraocular muscle. *J. Appl. Physiol.*, 95:692–699.
- Andrienko, T., Kuznetsov, A. V., Kaambre, T., Usson, Y., Orosco, A., Appaix, F., Tiivel, T., Sikk, P., Vendelin, M., Margreiter, R., Saks, V. A. (2003). Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.*, 206(Pt 12):2059-72.
- Arrio-Dupont, M. (1988). An example of substrate channeling between co-immobilized enzymes. Coupled activity of myosin ATPase and creatine kinase bound to frog heart myofilaments. *FEBS Lett.*, 240:181-185.
- Arrio-Dupont, M., Bechet, J. J., d'Albis, A. (1992). A model system of coupled activity of co-immobilized creatine kinase and myosin. *Eur. J. Biochem.*, 207:951-955.
- Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D., Sorrentino, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J. Cell Biol.*, 160:245–253.
- Bahler, M., Wallimann, T., Eppenberger, H. M. (1985). Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 6(6):783-800.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev.* 91:5-17.
- Bantle, S., Keller, S., Hausmann, I., Auerbach, D., Perriard, E., Muhlebach, S., Perriard, J. C. (1996). Tissue-specific isoforms of chicken myomesin are generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 271:19042–19052.

- Bennett P., Offer G., Pepe FA. (1986). Ultrastructural localization of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 7: 550-567.
- Bessman, S. P., Geiger, P. J. (1981). Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*, 211, 448-452.
- Bessman, S. P., Carpenter, C. L. (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:831-62.
- Bittl, J. A., Ingwall, J. S. (1985). Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A ³¹P NMR magnetization transfer study. *J. Biol. Chem.*, 260:3512-3517.
- Bowditch, J., Nigdikar, S., Brown, A. K., Dow, J.W. (1985). 5'-Nucleotidase activity of isolated mature rat cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 845(1):21–26.
- Brdiczka, D., Kaldis, P., Wallimann, T. (1994). In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. *J. Biol. Chem.*, 269:640-27 644.
- Brdiczka, D., Beutner, G., Rück, A., Dolder, M., Wallimann, T. (1998). The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors*, 8:235-242.
- Bremel, R. D., Weber, A. M. (1972). Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature*, 238:97-101.
- Carlsson, E., Thornell, L. E. (1987). Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res.*, 248:169–180.
- Carlsson, E., Grove, B. K., Wallimann, T., Eppenberger, H. M., Thornell, L. E. (1990). Myofibrillar M-band proteins in rat skeletal muscles during development. *Histochemistry*, 95:27–35.
- Cooke, R., Pate, E. (1985). The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys. J.*, 48(5):789-98.
- Cooper, J., Trinick, J. (1984). Binding and location of AMP deaminase in rabbit psoas muscle myofibrils. *J. Mol. Biol.*, 177(1):137–152.
- Craig, R., Offer, G. (1976). The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 192(1109):451-61.
- Danowski, B. A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J. M., Sanger, J. W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.*, 118:1411–1420.
- Dowell, R. T., Fu, M. C. (1992). Cardiac myofibrillar creatine kinase Km is not influenced by contractile protein binding. *Life Sci.*, 50(20):1551-9.
- Dunn, M. F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W. F., Houben, K. F., Leja, C. A., Roy, M. (1990). The tryptophan synthase holoenzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel. *Biochemistry*, 29:8598-8607.

- Dzeja, P. P., Zeleznikar, R. J., Goldberg, N. D. (1998). Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol. Cell. Biochem.*, 184:169–182.
- Dzeja, P. P., Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.*, 206:2039–2047.
- Dzeja, P. P., Terzic, A., Wieringa, B. (2004). Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Mol. Cell. Biochem.*, 256-257(1-2):13-27.
- Eggleton, G. P., Eggleton, P. (1929). A method of estimating phosphagen and some other phosphorus compounds in muscle tissue. *J. Physiol.*, 68(2):193–211.
- Elcock, A. H., Potter, M. J., Matthews, D. A., Knighton, D. R., McCammon, J. A. (1996). Electrostatic channeling in the bifunctional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *J. Mol. Biol.*, 262:370-374.
- Ellington, W. R., Roux, K., Pineda, A. O. (1998). Origin of octameric creatine kinases. *FEBS Lett.*, 425.
- Ellington, W. R. (2001). Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:289-325.
- Eppenberger, H. M., Dawson, D. M., Kaplan, N. O. (1967). The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *J. Biol. Chem.*, 242:204-209.
- Fischer, R. S., Fowler, V. M. (2003). Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.*, 13:593–601.
- Fiske, C. H., Subbarow, Y. (1927). The nature of inorganic phosphate in voluntary muscle. *Science*, 65: 401-403.
- Flick, M. J., Konieczny, S. F. (2000). The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta1-spectrin. *J. Cell Sci.*, 113:1553–1564.
- Foley, J. M., Adams, G. R., Meyer, R. A. (1994). Different effects of gradual vs. acute adenine nucleotide depletion on ATP cost of muscle contraction. *Am. J. Physiol.*, 267:1177–1184.
- Fossel, E.T., Hoefeler, H. (1987) A synthetic functional metabolic compartment. The role of propinquity in a linked pair of immobilized enzymes. *Eur J Biochem.*;170: 165-71.
- From, A. H., Petain, M. A., Michurski, S. P., Zimmer, S. D., Ugurbil, K. (1986). ³¹P-NMR studies of respiratory regulation in the intact myocardium. *FEBS Lett.*, 206:257–261.
- From, A. H., Zimmer, S. D., Michurski, S. P., Mohanakrishnan, P., Ulstad, V. K., Thoma, W. J., Ugurbil, K. (1990). Regulation of the oxidative phosphorylation rate in the intact cell. *Biochemistry*, 29:3731-3743.
- Furst, D. O., Gautel, M. (1995). The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 27(4):951-9.
- Gautel, M., Leonard, K., Labeit, S. (1993). Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J.*, 12(10):3827-34.
- George, S., Ishikawa, Y., Perryman, M. B., Roberts, R. (1984). Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, 259:2667-2674.

- Granzier, H., Labeit, S. (2002). Cardiac titin: an adjustable multifunctional spring. *J. Physiol.*, 541:335–342.
- Gregor, M., Mejsnar, J., Janovska, A., Zurmanova, J., Benada, O., Mejsnarova, B. (1999). Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibers and their myofibrils. *Physiol. Res.*, 48:27-35.
- Gregor M, Janovska A, Stefl B, Zurmanova J, Mejsnar J (2003). Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. *Exp Physiol.* 88(1):1-6.
- Gregorio, C. C., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:18–25.
- Gregorio, C. C., Perry, C. N., McElhinny, A. S. (2005). Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 26(6-8):389-400.
- Grossman, S. H., Mollo, E. (1979). Physical and serological comparison and hybridization of isozymes of creatine kinase from primates. *Int. J. Biochem.*, 10(4):367-81.
- Grove, B. K., Kurer, V., Lehner, C., Doetschman, T. C., Perriard, J. C., Eppenberger, H. M. (1984). A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, 98(2):518-24.
- Grove, B. K., Cerny, L., Perriard, J. C., Eppenberger, H. M. (1985). Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J. Cell Biol.*, 101(4):1413-21.
- Gudbjarnason, S., Mathes, P., Ravens, K. G. (1970). Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1(3):325-39.
- Hebisch, S., Sies, H., Soboll, S. (1986). Function dependent changes in the subcellular distribution of high energy phosphates in fast and slow rat skeletal muscles. *Pflugers. Arch.*, 406(1):20-4.
- Hemmer, W., Skarli, M., Perriard, J. C., Wallimann, T. (1993). Effect of okadaic acid on protein phosphorylation patterns of chicken myogenic cells with special reference to creatine kinase. *FEBS Lett.*, 327, 35-40.
- Hornemann, T., Stolz, M., Wallimann, T. (2000). Isoenzyme-specific interaction of muscle-type creatine kinase with the sarcomeric M-line is mediated by NH₂-terminal lysine charge-clamps. *J. Cell Biol.*, 149(6):1225-34.
- Hornemann, T., Kempa, S., Himmel, M., Hayess, K., Furst, D. O., Wallimann, T. (2003). Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol Biol.*, 332(4):877-87.
- Horowitz, R., Maruyama, K., Podolsky, R. J. (1989). Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 109:2169–2176.
- Horowitz, R. (2006). Nebulin regulation of actin filament lengths: new angles. *Trends Cell Biol.*;16(3):121-4.

<http://www.genecards.org>

- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W., Davies, D. R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, 263:17857-17871.
- Chance, B., Leigh, J. S. Jr., Kent, J., McCully, K., Nioka, S., Clark, B. J., Maris, J. M., Graham T. (1986). Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(24):9458-62.
- Chasiotis, D., Sahlin, K., Hultman, E. (1982). Regulation of glycogenolysis in human muscle at rest and during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 53(3):708-15.
- Chasiotis, D. (1983). The regulation of glycogen phosphorylase and glycogen breakdown in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 518:1-68.
- Ingwall, J. S., Atkinson, D. E., Clarke, K., Fetters, J. K. (1990). Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *Eur. Heart J., Suppl B*:108-115.
- Jacobus, W. E., Lehninger, A. L. (1973). Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J. Biol. Chem.* 248:4803-4810.
- Janovska, A., Mejsnar, J. A., Stefl, B. (1999). Muscle ATP synthesis and utilisation, balanced during flow-induced increase of respiration. *Mol. Cell. Biochem.*, 197(1-2):49-52.
- Janssen, E., Groof, A., Wijers, M., Fransen, J., Dzeja, P. P., Terzic, A., Wieringa, B. (2003). Adenylate kinase 1 deficiency induces molecular and structural adaptations to support muscle energy metabolism. *J. Biol. Chem.*, 278:12937–12945.
- Jennings, R. B., Reimer, K. A., Hill, M. L., Mayer, S. E. (1981). Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ. Res.*, 49(4):892–900.
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., Ventura-Clapier, R. (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ. Res.* 89, 153-159.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, 1:15–25.
- Kammermeier, H. (1987). Why do cells need phosphocreatine and a phosphocreatine shuttle? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 19:115-118.
- Karpen, J. W., Rich, T. C. (2004). Resolution of cAMP signals in three-dimensional microdomains using novel, real-time sensors. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 47:1-5.
- Katz, A., Andersson, D. C., Yu, J., Norman, B., Sandström, M. E., Wieringa, B., Westerblad, H. (2003). Contraction-mediated glycogenolysis in mouse skeletal muscle lacking creatine kinase: the role of phosphorylase b activation. *J. Physiol.*, 553.2:523-531.
- Keller, A., Demeurie, J., Merkulova, T., Geraud, G., Cywiner-Golenzer, C., Lucas, M., Chatelet, F. P. (2000). Fibre-type distribution and subcellular localisation of alpha and beta enolase in mouse striated muscle. *Biol. Cell*, 92:527–535.

- Kenny, P. A., Liston, E. M., Higgins, D. G. (1999). Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene*, 232:11–23.
- Kingsley-Hickman, P. B., Sako, E. Y., Mohanakrishnan, P., Robitaille, P. M., From, A. H., Foker, J. E., Ugurbil, K. (1987). ³¹P NMR studies of ATP synthesis and hydrolysis kinetics in the intact myocardium. *Biochemistry*, 26:7501–7510.
- Knappeis, G. G., Carlsen, F. (1968). The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 38:202–211.
- Knighton, D. R., Kan, C. C., Howland, E., Janson, C. A., Hostomska, Z., Welsh, K. M., Matthews, D. A. (1994). Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Nat. Struct. Biol.* 1, 186-194.
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Jones, E. M., Van Rossum, D. B., Bloch, R. J. (2003). Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell*, 14(3):1138-48.
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C., Randall, W. R., Bloch, R. J. (2004). Obscurin regulates the organization of myosin into A bands. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287(1):C209-17.
- Kraft, T., Messerli, M., Rothen-Rutishauser, B., Perriard, J. C., Wallimann, T., Brenner, B. (1995). Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys. J.*, 69(4):1246-58.
- Krause, S. M., Jacobus, W. E. (1992). Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, 267(4):2480-6.
- Kushmerick, M. J., Davies, R. E. (1969). The chemical energetics of muscle contraction. II. The chemistry, efficiency and power of maximally working sartorius muscles. Appendix. Free energy and enthalpy of ATP hydrolysis in the sarcoplasm. *Proc. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.*, 174(36):315–353.
- Kushmerick, M. J. (1994). A paradigm for energy balance in muscle function. In: *What is controlling life? Modern Trend in BioThermoKinetics* Edited by E. Gnaiger, F. N. Gellerich, M. Wyss. Innsbruck University Press, Vol 3., pp. 71-76.
- Kushmerick, M. J. (1998). Energy balance in muscle activity: simulations of ATPase coupled to oxidative phosphorylation and to creatine kinase. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 120:109-123.
- Labeit, S., Kolmerer, B. (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270(5234):293-296.
- Lane, A. N., Kirschner, K. (1991). Mechanism of the physiological reaction catalyzed by tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 30:479-484.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B. W., Perriard, J. C., Ehler, E. (2002). Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J. Cell Sci.*, 115:4925–4936.
- Lange, S. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308:1599–1603.
- Lawson, J. W., Veech, R. L. (1979). Effects of pH and free Mg²⁺ on the K_{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 254, 6528-6537.

- LeFurgey, A., Davilla, S. D., Kopf, D. A., Sommer, J. R., Ingram, P. (1992). Real-time quantitative elemental analysis and mapping: microchemical imaging in cell physiology. *J. Microsc.* 165(Pt 2):191-223.
- Levin, R. M., Longhurst, P. A., Levin, S. S., Haugaard, N., Wein, A. J. (1990). Creatine kinase activity of urinary bladder and skeletal muscle from control and streptozotocin-diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 97(2):153-9.
- Lim, M. S., Walch, M. P. (1986). Phosphorylation of skeletal and cardiac muscle C-Proteins by catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Cell. Biol.*, 64:622-630.
- Lohman, K. (1934). Über die enzymatische aufspaltung der kreatinephosphorsäure; zugleich ein beitrag zum chemismus der muskelkontraktion. *Biochem. Z.* 271, 264-277.
- Luther, P. K., Squire, J. M. (1980). Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. II. The myosin filament superlattice. *J. Mol. Biol.*, 141:409-439.
- Mainwood, G. W., Rakusan, K. (1982). A model for intracellular energy transport. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60:98-102.
- Malacova, D., Zurmanova, J., Mejsnar, J. (2004). Three isoelectric points of creatine kinase M-subunit, purified from myofibrils. *Physiol. Res.*, 53:22P.
- Masaki, T., Takaiti, O. (1974). M-protein. *J. Biochem. (Tokyo)*, 75(2):367-380.
- Matthews, P. M., Bland, J. L., Gadian, D. G., Radda, G. K. (1982). A ³¹P-NMR saturation transfer study of the regulation of creatine kinase in the rat heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 721(3):312-20.
- McClellan, G., Weisberg, A., Winegrad S. (1983). Energy transport from mitochondria to myofibril by a creatine phosphate shuttle in cardiac cells. *Am. J. Physiol.*, 245(5 Pt 1):C423-7.
- McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., Gregorio, C. C. (2002). Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.*, 157(1):125-36.
- McGilvery, R. W., Murray, T. W. (1974). Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilization of high energy phosphate by muscle. *J. Biol. Chem.*, 249(18):5845-50.
- McLoughlin, P., Ehler, E., Carlile, G., Licht, J. D., Schafer, B. W. (2002). The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Biol. Chem.*, 277(40):37045-53.

- Mejsnar, J. A., Kushmerick, M. J., Williams, D. L. (1992). Phosphocreatine and ATP concentrations increase during flow-stimulated metabolism in a non-contracting muscle. *Experientia*, 48(11-12):1125-7.
- Mejsnar, J. A., Sopko, B., Gregor, M. (2002). Myofibrillar creatine kinase activity inferred from a 3D model. *Physiol. Res.*, 51:35-41.
- Meyer, R. A., Sweeney, H. L., Kushmerick, M. J. (1984). A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am. J. Physiol.* 246, C365-377.
- Meyer, R. A. (1988). A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes. *Am. J. Physiol.*, 254, C548-553.
- Millman, B. M. (1998). The filament lattice of striated muscle. *Physiol. Rev.*, 78:359–391.
- Mommaerts, W. F. (1969). Energetics of muscular contraction. *Physiol. Rev.*, 49(3):427-508.
- Morrison, J. F., Ennor A. H. (1960). N-phosphorylated guanidines. In: *The Enzymes* (2nd ed.) edited by PD Boyer et al. New York: Academic Press, pp. 89-109.
- Muller, J. M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R., Schule, R. (2000). FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.*, 19(3):359-69.
- Nave, R., Fürst, D. O., Weber, K. (1989). Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J. Cell Biol.*, 109(5):2177–2187.
- Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T. (2003). A molecular approach to the concerted action of kinases involved in energy homeostasis. *Biochem. Soc. Trans.*, 31:169–174.
- Novotova, M., Pavlovicova, M., Veksler, V. I., Ventura-Clapier, R., Zahradnik, I. (2006). Ultrastructural remodeling of fast skeletal muscle fibers induced by invalidation of creatine kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291(6):C1279-85.
- Obermann, W. M., Plessmann, U., Weber, K., Furst, D. O. (1995). Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein, from bovine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 233(1):110-5.
- Obermann, W. M., Gautel, M., Weber, K., Furst, D. O. (1997). Molecular structure of the sarcomeric M-band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO. J.*, 16:211–220.
- Obermann, W. M., Ven, P. F. van der, Steiner, F., Weber, K., Furst, D. O. (1998). Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M band. *Mol. Biol. Cell*, 9:829–840.
- Ouporov, I. V., Knull, H. R., Huber, A., Thomasson, K. A. (2001). Brownian dynamics simulations of aldolase binding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and the possibility of substrate channeling. *Biophys. J.*, 80:2527-2535.

- Ovadi, J. (1991). Physiological significance of metabolite channelling: author's response to commentaries. *J. Theor. Biol.*, 152:135-141.
- Pardo, J. V., Siliciano, J. D., Craig, S. W. (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ('costameres') mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1008-1012.
- Pask, H. T., Jones, K. L., Luther, P. K., Squire, J. M. (1994). M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 15:633-645.
- Patel, T. J., Lieber, R. L. (1998). Force transmission in skeletal muscle: from actomyosin to external tendons. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 25:321-363.
- Perry, S. V. (1954). Creatine phosphokinase and the enzymic and contractile properties of the isolated myofibril. *Biochem. J.*, 57(3):427-34.
- Pierobon-Bormioli, S. (1981). Transverse sarcomere filamentous systems: 'Z-and M-cables'. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2:401-413.
- Pizon, V., Iakovenko, A., Ven, P. F. van der, Kelly, R., Fatu, C., Furst, D. O., Karsenti, E., Gautel, M. (2002). Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J. Cell. Sci.*, 115(Pt 23):4469-82.
- Ponticos, M., Lu, Q. L., Morgan, J. E., Hardie, D. G., Partridge, T. A., Carling, D. (1998). Dual regulation of AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.*, 17:1688-1699.
- Price, M. G., Gomer, R. H. (1993). Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filament proteins. *J. Biol. Chem.*, 268:21800-21810.
- Pucar, D., Bast, P., Gumina, R. J., Lim, L., Drahl, C., Juranic, N., Macura, S., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A., Dzeja, P. P. (2002). Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283:H776-H782.
- Pucar, D., Dzeja, P. P., Bast, P., Gumina, R. J., Drahl, C., Lim, L., Juranic, N., Macura, S., Terzic, A. (2004). Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by 18O-assisted 31P NMR and 1H NMR spectroscopy. *Mol. Cell. Biochem.*, 256-257:281-289.
- Quemeneur, E., Marcillat, O., Eichenberger, D., Vial, C. (1989). Isoelectric point heterogeneity of the two oligomeric forms of heart mitochondrial creatine kinase. *Biochem. Int.*, 18:365-371.
- Roman, B. B., Meyer, R. A., Wiseman, R. W. (2002). Phosphocreatine kinetics at the onset of contractions in skeletal muscle of MM creatine kinase knockout mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283: C1776-C1783.
- Rossi, A. M., Eppenberger, H. M., Volpe, P., Cotrufo, R., Wallimann, T. (1990). Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J. Biol. Chem.*, 265:5258-5266.
- Russell, M. W., Raeker, M. O., Korytkowski, K. A., Sonneman, K. J. (2002). Identification, tissue expression and chromosomal localization of human Obscurin-MLCK, a member of the titin and Dbl families of myosin light chain kinases. *Gene*, 282(1-2):237-46.

- Saks, V. A., Ventura-Clapier, R. (1992). Biochemical organization of energy metabolism in muscle. *J. Biochem. Org.*, 1:9-29.
- Saks, A. V., Wallimann, T., Schlattner, U. (2005). Calcium and energy transfer. *J. Physiol.*, 565(Pt 2):703.
- Sasaki, N., Sato, T., Marban, E., O'Rourke, B. (2001). ATP consumption by uncoupled mitochondria activates sarcolemmal K(ATP) channels in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 280:H1882-H1888
- Savabi, F., Geiger, P. J., Bessman, S. P. (1983). Kinetic properties and functional role of creatine phosphokinase in glycerinated muscle fibers--further evidence for compartmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 785-790.
- Savabi, F. (1988). Free creatine available to the creatine phosphate energy shuttle in isolated rat atria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(20):7476-80.
- Sharov, V. G., Saks, V. A., Smirnov, V. N., Chazov, E. I. (1977). An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 468(3):495-501.
- Schlattner, U., Forstner, N., Eder, M., Stachowiak, O., Fritz-Wolf, K., Wallimann, T. (1998). Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol. Cell. Biochem.*, 184:125-140.
- Schlattner, U., Wallimann, T. (2000). A quantitative approach to membrane binding of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase using surface plasmon resonance. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 32:123-131.
- Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M. (2001). Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J. Biol. Chem.*, 276(51):48027-30.
- Schlattner, U., Gehring, F., Vernoux, N., Tokarska-Schlattner, M., Neumann, D., Marcillat, O., Vial, C., Wallimann, T. (2004). C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, 279(23):24334-42.
- Schlegel, J., Wyss, M., Schurch, U., Schnyder, T., Quest, A., Wegmann, G., Eppenberger, H. M., Wallimann, T. (1988). Mitochondrial creatine kinase from cardiac muscle and brain are two distinct isoenzymes but both form octameric molecules. *J. Biol. Chem.*, 263:16963-16969.
- Siemankowski, R. F., White, H. D. (1984). Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J. Biol. Chem.*, 259(8):5045-53.
- Sjostrom, M., Squire, J. M. (1977). Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J. Mol. Biol.*, 109:49-68.
- Sleep, J., Glyn, H. (1986). Inhibition of myofibrillar and actomyosin subfragment 1 adenosinetriphosphatase by adenosine 5'-diphosphate, pyrophosphate, and adenylyl-5'-yl imidodiphosphate. *Biochemistry*, 25(5):1149-54.
- Soldati, T., Schafer, B. W., Perriard, J. C. (1990). Alternative ribosomal initiation gives rise to chicken brain-type creatine kinase isoproteins with heterogeneous amino termini. *J. Biol. Chem.* 265:4498-4506.

- Spivey, H.O., Ovadi, J. (1999). Substrate channeling. *Methods* 19, 306-321.
- Srere, P. A. (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:89-124.
- Steeghs, K., Benders, A., Oerlemans, F., Haan, A. de, Heerschap, A., Ruitenbeek, W., Jost, C., Deursen, J. van, Perryman, B., Pette, D., Bruckwilder, M., Koudijs, J., Jap, P., Veerkamp, J., Wieringa, B. (1997). Altered Ca²⁺ responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell*, 89: 93–103.
- Steeghs, K., Oerlemans, F., Haan, A. de, Heerschap, A., Verdoodt, L., Bie, M. de, Ruitenbeek, W., Benders, A., Jost, C., Deursen, J. van, Tullson, P., Terjung, R., Jap, P., Jacob, W., Pette, D., Wieringa, B. (1998). Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Mol. Cell. Biochem.*, 184:183–194.
- Stefl, B., Mejsnar, J. A., Karasova, J. (1994). Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. *Physiol. Res.*, 43(3):175-80.
- Stefl, B., Mejsnar, J. A., Janovska, A. (1999). Energy metabolism of rat skeletal muscle modulated by the rate of perfusion flow. *Exp. Physiol.*, 84(4):651-63.
- Steiner, F., Weber, K., Furst, D. (1999). M-band proteins myomesin and skelemin are incoded by the same gene: analysis of its organisation and expression. *Genomics*, 56:78–89.
- Stolz, M., Wallimann, T. (1998). Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK. *J. Cell Sci.*, 111:1207-1216.
- Stolz, M., Hornemann, T., Schlattner, U., Wallimann, T. (2002). Mutation of conserved active-site threonine residues in creatine kinase affects autophosphorylation and enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 363(Pt 3):785-92.
- Strehler, E.E., Carlsson, E., Eppenberger, H. M., Thornell, L. E. (1983). Ultrastructural localization of M-band proteins in chicken breast muscle as revealed by combined immunocytochemistry and ultramicrotomy. *J. Mol. Biol.*, 166:141–158.
- Stroud, R. M. (1994). An electrostatic highway. *Nat. Struct. Biol.*, 1:131-134.
- Sweeney, H. L. (1994). The importance of the creatine kinase reaction: the concept of metabolic capacitance. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 26:30-36.
- Thornell, L. E., Carlsson, E., Kugelberg, E., Grove, B. K. (1987). Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am. J. Physiol.*, 253(3 Pt 1):C456-68.
- Trask, R. V., Strauss, A. W., Billadello, J. J. (1988). Developmental regulation and tissue-specific expression of the human muscle creatine kinase gene. *J. Biol. Chem.*, 263:7142-17149.
- Trinick, J., Lowey, S. (1977). M-protein from chicken pectoralis muscle: isolation and characterization. *J. Mol. Biol.*, 113(2):343–368.
- Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4:679–689.
- Turner, D. C., Wallimann, T., Eppenberger, H. M. (1973). A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(3):702-5.

- Van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Ruitenbeek, W., Jap, P., Ter Laak, H., Wieringa, B. (1993). Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell*, 74: 621–631.
- Vassort, G., Ventura-Clapier, R. (1977). Significance of creatine phosphate on the hypodynamic frog heart. *J. Physiol.*, 269(1):86P-87P.
- Vaughan, K. T., Weber, F. E., Fischman, D. A. (1992). cDNA cloning and sequence comparisons of human and chicken muscle C-protein and 86kD protein. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 46:167-77.
- Veech, R. L., Lawson, J. W. R., Cornell, N. W., Krebs, H. A. (1979). Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.*, 254:6538-47.
- Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Anfous, K., Mateo, P., Deursen, J. van, Wieringa, B., Ventura-Clapier, R. (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice: II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J. Biol. Chem.*, 270:19921–19929.
- Vendelin, M., Eimre, M., Seppet, E., Peet, N., Andrienko, T., Lemb, M., Engelbrech, J., Seppet, E. K., Saks, V. A. (2004). Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle. *Mol. Cell. Biochem.*, 256-257(1-2):229-41.
- Ventura-Clapier, R., Saks, V. A., Vassort, G., Lauer, C., Elizarova, G. V. (1987). Reversible MM-creatine kinase binding to cardiac myofibrils. *Am. J. Physiol.*, 253:C444-455.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A. V., d'Albis, A., Deursen, J. van, Wieringa, B., Veksler, V. I. (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J. Biol. Chem.*, 270(34):19914-20.
- Vinkemeier, U., Obermann, W., Weber, K., Fürst, D. O. (1993). The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J. Cell Sci.*, 106(Pt 1):319–330.
- Wallimann, T., Turner, D. C., Eppenberger, H. M. (1977). Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 75(2 Pt 1):297-317.
- Wallimann, T., Eppenberger, H. M. (1985). Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell Muscle Motil.*, 6:239-285.
- Wallimann, T., Schnyder, T., Schlegel, J., Wyss, M., Wegmann, G., Rossi, A. M., Hemmer, W., Eppenberger, H. M., Quest, A. F. (1989). Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl-creatine circuit. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 315:159-176.
- Wallimann, T., Eppenberger, H. M. (1990). The subcellular compartmentation of creatine kinase isozymes as a precondition for a proposed phosphoryl-creatine circuit. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 344:877-889.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “PCr-circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 281:21-40.
- Wallimann, T., Hemmer, W. (1994). Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 133-134:193-220.

- Walzel, B., Speer, O., Boehm, E., Kristiansen, S., Chan, S., Clarke, K., Magyar, J. P., Richter, E. A., Wallimann, T. (2002). New creatine transporter assay and identification of distinct creatine transporter isoforms in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 283(2):E390-401.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R. (1983). A network of transverse and longitudinal intermediate filaments is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 96:562–570.
- Wegmann, G., Zanolla, E., Eppenberger, H. M., Wallimann, T. (1992). In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 13:420-435.
- Wiesen, M. H., Bogdanovich, S., Agarkova, I., Perriard, J. C., Khurana, T. S. (2007). Identification and characterization of layer-specific differences in extraocular muscle m-bands. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48(3):1119-27.
- Williams, M. W., Bloch, R. J. (1999). Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 20: 383–393.
- Winder, W. W. (2001). Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, 1017-1028.
- Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C., Labeit, S. (2005). MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol.*, 350(4):713-22.
- Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R., Wallimann, T. (1992). Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1102:119-166.
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.*, 80(3):1107-213.
- Yamada, T., Sugi, H. (1989). Regulation of glycogenolysis in contracting frog skeletal muscle studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 315:149–157.
- Young, P., Ehler, E., Gautel, M. (2001). Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J. Cell Biol.*, 154(1):123-36.
- Zhao, T. J., Yan, Y. B., Liu, Y., Zhou, H. M. (2007). The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]
- Zurmanova, J., Difato, F., Malacova, D., Mejsnar, J., Stefl, B., Zahradnik, I. (2007) Creatine kinase binds more firmly to the A-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates (accepted *Moll Cell Biochem* 2007)

Příloha 1

Přehled genové exprese isoform CK
a porovnání primárních struktur
(<http://www.genecards.org>)

